

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/001257

International filing date: 08 February 2005 (08.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT
Number: MI2004A000230
Filing date: 12 February 2004 (12.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 04 April 2005 (04.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

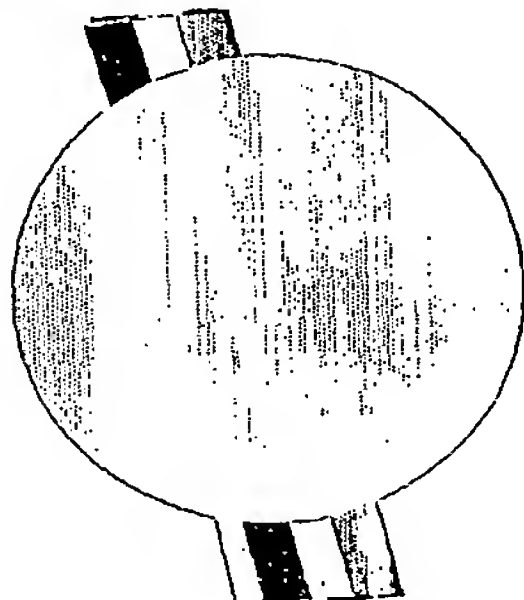


**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. MI 2004 A 000230**

EP/05/1257

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

Roma, li.....15 FEB. 2005



IL FUNZIONARIO

Paola Giuliano
Dressa Paola Giuliano

MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

MI 2004 A 0 0 0 2 3 0

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N° _____



A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	DEFIANTE FARMACÊUTICA LDA.		
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	PG	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4	FUNCHAL - MADEIRA (PORTOGALLO) - PT		
B. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO	B0	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1			
INDIRIZZO	B2			
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	B3			
C. TITOLO	C1	"COMPOSTI AD ATTIVITÀ ANTITUMORALE"		

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	PELUSO GIANFRANCO
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	CALVANI MENOTTI
NAZIONALITÀ	D2	

FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I	BANFI PAOLO 
--------------------------------	---



MODULO A (2/2)

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI, CONSAPOVOLE/I DELLE SANZIONI PREVISTE DALL'ART. 76 DEL D.P.R. 28/12/2000 N. 455.

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME;	I1	BIANCHETTI GIUSEPPE ED ALTRI
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	BIANCHETTI BRACCO MINOJA S.r.l.
INDIRIZZO	I3	Via Rossini 8
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	I4	20122 MILANO (MI)
TELEFONO		02/76021218
FAX		02/783078 - 02/76024366
E-MAIL		mailbox@scb.it
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	LETTERA INCARICO (CON RISERVA)

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENTO	N. ES. ALL.	N. ES. RIS.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ.	1		21
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE)	1		1
DESIGNAZIONE D'INVENTORE			
DOCUMENTI DI PRIORITÀ CON TRADUZIONE IN ITALIANO			
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE			
	(SI/NO)		
LETTERA D'INCARICO	NO		
PROCURA GENERALE			
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE			
	(EURO)		
ATTESTATI DI VERSAMENTO	EURO	DUECENTONOVANTUNO/80#	
DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? (SI/NO)	SI		
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO? (SI/NO)	NO		
DATA DI COMPILAZIONE	12/02/2004		
FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I	BANFI PAOLO		

IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	MI 2004 A 000230		
C.C.I.A.A. DI	MILANO		COD. 15
IN DATA	12 FEB. 2004	IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO	
LA PRESENTE DOMANDA, CORREDATA DI N.	CC	FOGLI AGGIUNTIVI, PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRARIPORTATO.	
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE			
IL DEPOSITANTE	CORTONESI MAURIZIO		

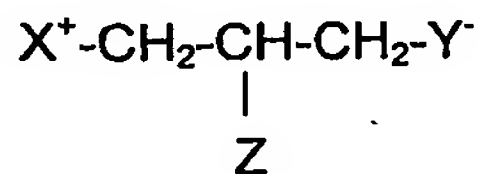


PROSPETTO MODULO A
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DI DOMANDA: MI 2004 A 0 0 0 2 3 0	DATA DI DEPOSITO: 12 FEB. 2004
A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO	
DEFIANTE FARMACÉUTICA LDA. FUNCHAL - MADEIRA (PORTOGALLO) - PT	
C. TITOLO	
"COMPOSTI AD ATTIVITÀ ANTITUMORALE"	

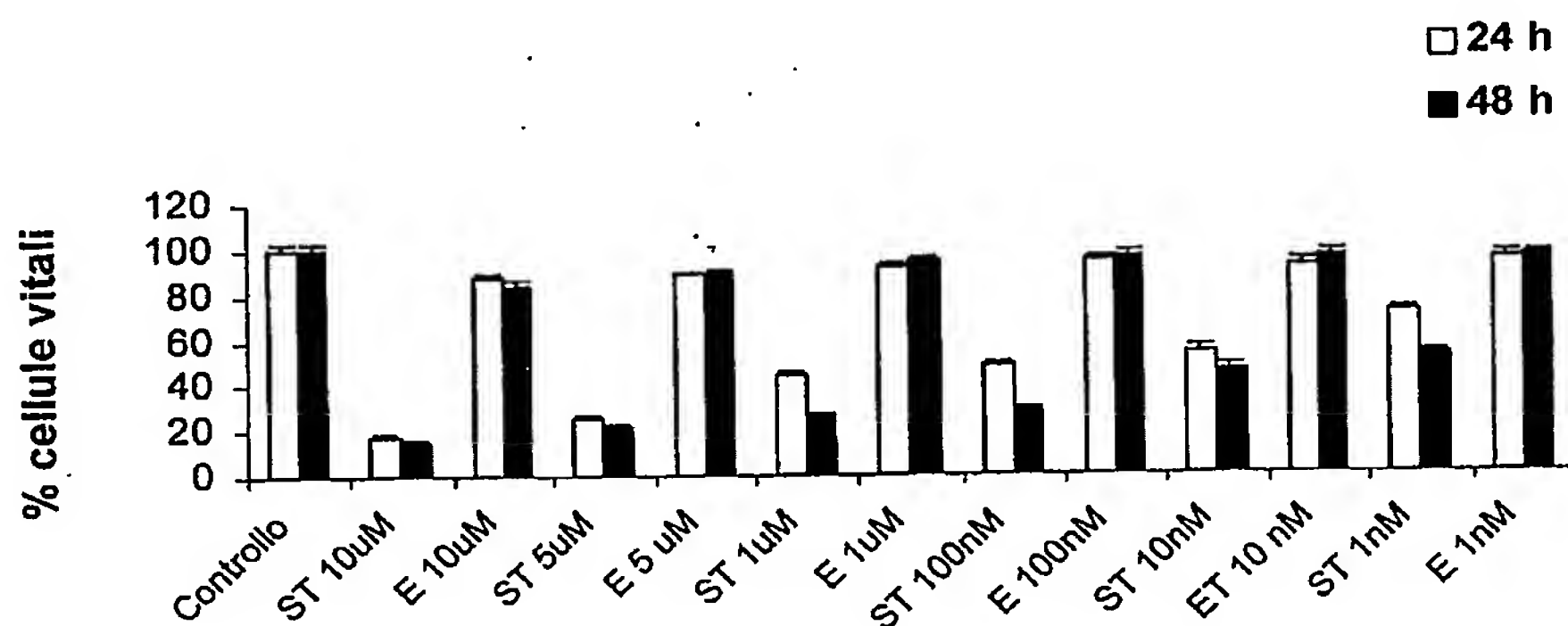
O. RIASSUNTO

Si descrive l'uso di composti di formula (I)



dove X, Y e Z sono definiti nella descrizione dell'invenzione, per la preparazione di un medicamento antitumorale, eventualmente in associazione con altre sostanze biologicamente attive.

P. DISEGNO PRINCIPALE



Figura

FIRMA DEL/DEI
RICHIEDENTE/I

BANFI PAOLO



7123 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

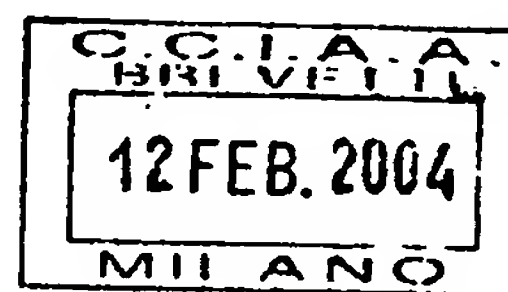
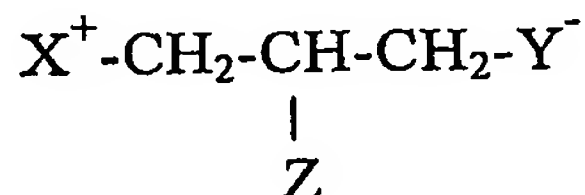
PB/mgg "COMPOSTI AD ATTIVITÀ ANTITUMORALE"

a nome : DEFIANTE FARMACÊUTICA LDA.

con sede in : Funchal - Madeira (Portogallo)

* * *

La presente invenzione riguarda una nuova classe di composti ad attività antitumorale. Più precisamente l'invenzione si riferisce all'uso di composti di formula generale (I):



dove X^+ è scelto tra $N^+(R_1, R_2, R_3)$ e $P^+(R_1, R_2, R_3)$, in cui R_1, R_2, R_3 sono scelti tra H ed alchili uguali o diversi, lineari o ramificati, aventi da 1 a 9 atomi di carbonio,

-CH=NH(NH₂), -NH₂, -OH; oppure uno o più tra R_1, R_2 e R_3 formano con l'azoto un sistema eterociclico saturo o insaturo, monociclico o biciclico; con la condizione che almeno uno tra R_1, R_2, R_3 è diverso da H;

Z è scelto tra:

-OR₄,

-OCOOR₄,

-OCONHR₄,

-OCSNHR₄,

-OCSOR₄,

-NHR₄,

-NHCOR₄,

-NHCSR₄,

MI 2004 A 0 0 0 2 3 0

-NHCOOR₄,

-NHCSOR₄,

-NHCONHR₄,

-NHCSNHR₄,

-NHSOR₄,

-NHSONHR₄,

-NHSO₂R₄,

-NHSO₂NHR₄,

-SR₄,

dove R₄ è un alchile avente da 2 a 20 atomi di carbonio;

Y⁻ è scelto tra -COO-, -PO₃H-, -OPO₃H-, tetrazolato-5-il,

per la preparazione di un medicamento antitumorale.

Tra i composti di formula generale I, sono preferiti quelli in cui X è un gruppo N(R₁, R₂, R₃), più preferibilmente X è trimetilammonio. Se presente, il sistema eterociclico formato da R₁, R₂ e R₃ è preferibilmente scelto tra morfolinio, piridinio, pirrolidinio, chinolinio, chinuclidinio.

In un altro caso preferito, R₁ e R₂ sono rappresentati da H, ed R₃ è scelto tra -CH=NH(NH₂), -NH₂, -OH.

Il gruppo R₄ è preferibilmente un alchile lineare o ramificato, saturo o insaturo, contenente da 7 a 20 atomi di carbonio. I gruppi R₄ preferiti sono scelti tra eptile, ottile, nonile, decile, undecile, dodecile, tridecile, tetradecile, pentadecile, esadecile, eptadecile, octadecile, nonadecile, eicosile.

Esempi preferiti di Z sono i gruppi ureido (-NHCONHR₄) e carbammato (-OCONHR₄).

In particolare si preferiscono i composti di formula (I) in cui X⁺, R₁,

R_2 , R_3 hanno i significati sopra descritti, Z è ureido ($-\text{NHCONHR}_4$) o carbammato ($-\text{OCONHR}_4$), ed R_4 è un alchile lineare o ramificato, saturo o insaturo, avente da 7 a 20, preferibilmente da 9 a 18 atomi di carbonio. I prodotti di formula (I) posseggono un centro di asimmetria sull'atomo di carbonio legato al gruppo Z. Ai fini della presente invenzione, ciascuno dei prodotti di formula (I) può esistere sia come miscela racemica R,S, sia nelle forme isomeriche separate R/S.

I prodotti di formula (I) sono derivati ammonici o fosfonici quaternari (X^+) sempre contenenti un gruppo anionico (Y^-). Dipendentemente dal pH, ciascuno dei prodotti di formula (I) può esistere indifferentemente come anfoione (sale interno), o come prodotto in cui Y^- è presente in forma YH.

In tal caso X^+ è salificato con l'anione di un acido farmacologicamente accettabile. La formula (I) copre tutte queste diverse possibilità di salificazione.

Prodotti di formula (I) maggiormente preferiti sono i seguenti:

- 1) R,S-4-trimetilammonio-3-(nonilcarbamoil)-ammino-butirrato
- 2) R,S-4-chinuclidinio-3-(tetradecilossicarbonil)-ossi-butirrato
- 3) R,S-4-trimetilammonio-3-(nonilcarbamoil)-ossi-butirrato
- 4) Acido R,S-4-trimetilammonio-3-(nonilossicarbonil)-ossi-butirrico cloruro
- 5) R,S-4-trimetilfosfonio-3-(nonilcarbamoil)-ossi-butirrato
- 6) R,S-4-trimetilammonio-3-(ottilossicarbonil)-ammino-butirrato
- 7) R,S-4-trimetilammonio-3-(nonilossicarbonil)-ammino-butirrato
- 8) R,S-4-trimetilammonio-3-ottilossi-butirrato
- 9) R,S-4-trimetilammonio-3-tetradecilossi-butirrato
- 10) R,S-1-guanidinio-2-tetradecilossi-3-(tetrazol-5-il)-propano

- 11) R,S-1-trimetilammonio-2-tetradecilossi-3-(tetrazol-5-il)-propano
- 12) R,S-3-chinuclidinio-2-(tetradecilossicarbonil)-ossi-1-propanfosfonato
monobasico
- 13) R,S-3-trimetilammonio-2-(nonilamminocarbonil)-ossi-1-propanfosfonato
monobasico
- 14) Acido R,S-3-priridinio-2-(nonilamminocarbonil)-ossi-1-propanfosfonico
cloruro
- 15) R-4-trimetilammonio-3-(tetradecilcarbamoil)-ammino-butirrato
- 16) R-4-trimetilammonio-3-(undecilcarbamoil)-ammino-butirrato
- 17) R-4-trimetilammonio-3-(eptilcarbamoil)-ammino-butirrato
- 18) R,S-4-trimetilammonio-3-(noniltiocarbamoil)-ammino-butirrato
- 19) R-4-trimetilammonio-3-(nonilcarbamoil)-ammino-butirrato
- 20) S-4-trimetilammonio-3-(nonilcarbamoil)-ammino-butirrato
- 21) S-4-trimetilammonio-3-(tetradecilcarbamoil)-ammino-butirrato
- 22) R,S-4-trimetilammonio-3-tetradecilammino-butirrato
- 23) R,S-4-trimetilammonio-3-ottilammino-butirrato
- 24) R,S-4-trimetilammonio-3-(decansolfonil)-ammino-butirrato
- 25) R,S-4-trimetilammonio-3-(nonilsolfamoil)-ammino-butirrato
- 26) S-4-trimetilammonio-3-(dodecansolfonil)-ammino-butirrato
- 27) R-4-trimetilammonio-3-(dodecansolfonil)-ammino-butirrato
- 28) S-4-trimetilammonio-3-(undecilsolfamoil)-ammino-butirrato
- 29) R-4-trimetilammonio-3-(undecilsolfamoil)-ammino-butirrato
- 30) R-4-trimetilammonio-3-(dodecilcarbamoil)-ammino-butirrato
- 31) R-4-trimetilammonio-3-(10-fenossidecilcarbamoil)-ammino-butirrato
- 32) R-4-trimetilammonio-3-(trans-b-stirenesolfonil)-ammino-butirrato



La preparazione dei composti di formula (I) è descritta nella domanda di brevetto pubblicata al numero WO 99/59957 a nome della stessa richiedente, qui interamente incorporata per riferimento. Nella stessa domanda di brevetto si descrive l'uso dei composti (I) per il trattamento di stati iperglicemici quali il diabete e le patologie ad esso associate. L'attività terapeutica dei composti (I) è attribuita ad un loro effetto di inibizione della carnitina palmitoil trasferasi (CPT).

In studi in vitro su diverse linee cellulari tumorali, si è sorprendentemente trovato che i composti (I) sono in grado di esercitare un marcato effetto antiproliferativo e tumoricida indipendente dall'attività di inibizione di CPT. A riprova di ciò, un noto inibitore della CPT-1, l'etomoxir, saggiato nelle stesse condizioni sperimentali utilizzate per i composti (I), non mostrava alcuna attività antiproliferativa o tumoricida. I risultati in vitro sono stati successivamente confermati in vivo su modelli animali di tumore. Anche in questo caso, i composti (I) si sono dimostrati efficaci nel ridurre la massa tumorale a bassi dosaggi senza effetti collaterali di rilievo.

E' pertanto oggetto della presente invenzione l'utilizzo dei composti (I) nella preparazione di un medicamento antitumorale.

Tra i tumori che possono essere trattati con i composti (I) si citano in particolare leucemie, carcinomi, linfomi, sarcomi, cancro della mammella, polmone, stomaco, testa e collo, retto, vescica ed altri, preferibilmente leucemia ed epatocarcinoma. Il trattamento terapeutico può essere effettuato a diversi stadi della crescita, proliferazione o diffusione tumorale.

Per l'uso in terapia, i composti I dovranno essere formulati con veicoli ed eccipienti farmaceuticamente accettabili. Le composizioni farmaceutiche

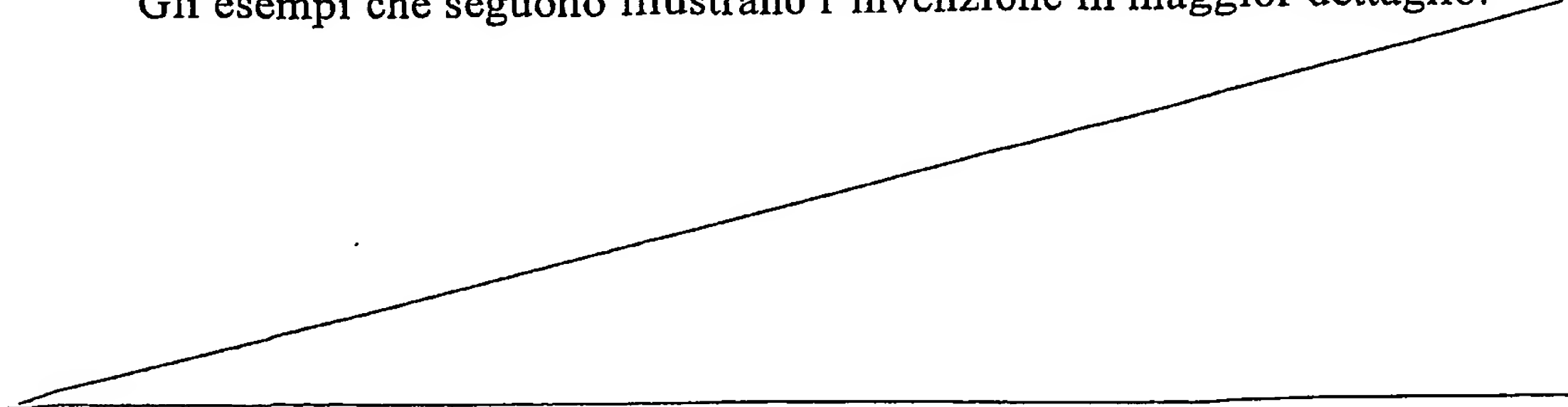
secondo la presente invenzione sono idonee alla somministrazione orale, parenterale, rettale, transdermica o intralesionale. Esempi di forme orali e parenterali comprendono capsule, compresse, granulati, polveri, sciroppi e, rispettivamente, soluzioni o emulsioni.

Il dosaggio dei composti (I) varia in relazione al tipo di prodotto impiegato, alla via di somministrazione e al grado di avanzamento della malattia. E' generalmente accettabile un dosaggio che permetta di ottenere una concentrazione plasmatica di principio attivo pari a 0,1-50 μ M, preferibilmente 0,5-30 μ M.

Un altro aspetto dell'invenzione riguarda preparazioni contenenti un composto (I) in combinazione con agenti antitumorali diversi, per uso simultaneo, separato o sequenziale nel trattamento del tumore. Esempi di agenti antitumorali che possono essere utilizzati in associazione con i composti (I) comprendono sostanze citotossiche o citostatiche, antimetaboliti, antiormonali, alcaloidi, antibiotici, in particolare antraciclinici, agenti alchilanti, peptidi, modificatori della risposta biologica, citochine ed altri.

La scelta della specifica combinazione di principi attivi, del loro dosaggio e modalità di somministrazione, dipende dal tipo di tumore, dalla sua eventuale resistenza al trattamento farmacologico, dalla tolleranza del paziente e da altre variabili da valutare di volta in volta.

Gli esempi che seguono illustrano l'invenzione in maggior dettaglio. —



Esempio 1

Effetto inibitorio sulla proliferazione ed attività proapoptotica del composto R-4-trimetilammonio-3-(tetradecilcarbamoil)-ammino-butirrato (ST1326) su cellule di epatocarcinoma umano (HepG2) *in vitro*.

La linea cellulare tumorale HepG2 è stata fornita da ATCC (American Type Cell Culture – Mannas, Virginia, numero HB-8065) e successivamente sviluppata nel nostro laboratorio. Le cellule sono state coltivate in terreno MEM integrato con FCS (siero fetale bovino) al 10%, Na-piruvato 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoacidi non essenziali 0,1 mM, e antibiotici (penicillina/streptomicina). Tale mezzo di coltura viene definito terreno completo. Tutti i terreni e i prodotti ancillari utilizzati per la coltura sono stati forniti da Hyclone-Celbio, Milano. Le cellule sono state inoculate in capsule di Petri di 60 mm di diametro. Dopo il piastramento le cellule sono state lasciate crescere per 24 ore prima del trattamento.

L'esperimento è stato condotto aggiungendo a cellule HepG2 a semiconfluenza dosi scalari della molecola da saggiare (Kogure et al. Cancer Chemother. Pharmacol., 2003; DOI. 10.1007/s); l'effetto antiproliferativo e proapoptotico è stato valutato a differenti tempi dall'inizio della coltura.

Il disegno sperimentale ha previsto l'aggiunta del composto in alcuni casi solo all'inizio della coltura cellulare verificandone gli effetti ai tempi prestabiliti, in altri riesposizione alla sostanza ogni 24 ore dopo aver opportunamente allontanato il mezzo condizionato ed aver lavato le cellule con terreno completo. La conta cellulare è stata effettuata in camera di Bürker con opportune diluizioni in presenza di colorante vitale per evidenziare le cellule vive. In particolare, il conteggio delle cellule è stato eseguito

manualmente tramite il metodo di esclusione del trypan blue a 0, 24 e 48 ore dal trattamento. Per ciascun esperimento sono state eseguite almeno 10 conte cellulari differenziate e ogni trattamento è stato eseguito in quadruplicato.

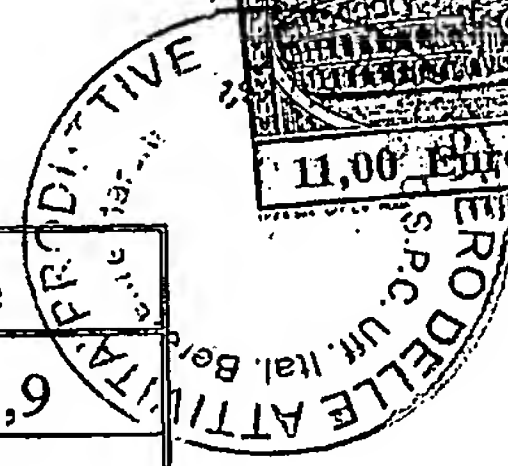
Un'ulteriore analisi ha previsto l'uso della citofluorimetria utilizzando come marcatore delle cellule vitali lo ioduro di propidio. Il composto è stato saggiato verso una molecola di analoga attività (etomoxir) per valutare se l'eventuale effetto tumoricida era da attribuire alla sola inibizione della CPT-1 o sottintendeva meccanismi assolutamente originali. I dati indicativi sono elencati nella figura.

Sorprendentemente i risultati hanno dimostrato che solo il composto ST1326 è stato in grado di evidenziare in vitro un effetto antiproliferativo abbinato ad una significativa azione tumoricida.

Contemporaneamente sono stati eseguiti saggi sulla vitalità cellulare utilizzando tecniche di citofluorimetria a flusso. I dati riassunti nella tabella 1 riguardano cellule trattate un'unica volta al tempo 0; la mortalità cellulare (a 24, 48 e 72 ore) è stata calcolata in percentuale (media \pm deviazione standard) rispetto a 10.000 eventi acquisiti.

Tabella 1

TRATTAMENTO	24 ore	48 ore	72 ore
Controllo	9,5 \pm 1,1	10,2 \pm 0,47	11,78 \pm 1,9
Etomoxir 5 μ M	10,8 \pm 1,65	11,8 \pm 0,4	10,1 \pm 2,1
Etomoxir 20 μ M	13,04 \pm 1,07	11,2 \pm 1,3	11,7 \pm 1,3
ST1326 0,1 μ M	15,3 \pm 2,1	27,3 \pm 2,2	49,9 \pm 1,2
ST1326 5 μ M	25,78 \pm 1,70	56,29 \pm 1,51	93,48 \pm 1,5
ST1326 10 μ M	53,21 \pm 1,5	85,10 \pm 0,9	96,3 \pm 1,1
ST1326 20 μ M	88,22 \pm 1,9	89,10 \pm 0,17	98,51 \pm 1,3



Sono stati anche effettuati esperimenti in cui la molecola da saggiare è stata aggiunta, come già precedentemente descritto, ogni 24 ore dopo aver opportunamente prelevato i supernatanti delle colture e lavate le stesse con terreno completo. In questo caso si è voluto evidenziare l'effetto additivo di successive aggiunte della molecola sulla vitalità cellulare (tabella 2). Il controllo è stato effettuato eliminando il supernatante ed aggiungendo solo terreno completo. La mortalità cellulare (a 48 e 72 ore) è stata calcolata in percentuale (media \pm deviazione standard) rispetto a 10.000 eventi acquisiti.

Tabella 2

TRATTAMENTO	48 ore *	72 ore **
Controllo	9,3 \pm 1,3	13,06 \pm 1,5
Etomoxir 5 μ M	10,17 \pm 1,7	12,6 \pm 1,1
Etomoxir 20 μ M	13,9 \pm 1,2	14,1 \pm 0,9
ST1326 0,1 μ M	45 \pm 2,0	56,5 \pm 1,2
ST1326 5 μ M	64,7 \pm 1,7	89,7 \pm 1,4
ST1326 10 μ M	87,5 \pm 2,03	91,3 \pm 1,9
ST1326 20 μ M	93,9 \pm 1,03	98,1 \pm 0,9

*: seconda aggiunta della molecola da saggiare dopo aver eliminato il supernatante;

**: terza aggiunta della molecola da saggiare dopo aver eliminato il supernatante.

Esempio 2

Attività proapoptotica del composto ST1326 su cellule di leucemia acuta a cellule T (Jurkat) *in vitro*.

La linea cellulare tumorale Jurkat è stata fornita da ATCC (American Type Cell Culture – Mannas, Virginia, numero TIB-152) e successivamente

svilupata nel nostro laboratorio. Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI 1640 integrato con FCS (siero fetale bovino) al 10%, Na-piruvato 1 mM, L-glutamina 2 mM, glucosio 4,5 g/L, HEPES 10 mM, e antibiotici (penicillina/streptomicina). Tale mezzo di coltura viene definito terreno completo. Tutti i terreni e i prodotti ancillari utilizzati per la coltura sono stati forniti da Hyclone-Celbio, Milano. Le cellule sono state inoculate in fiasche da 25 mm². Dopo il piastramento le cellule sono state lasciate sviluppare per 24 ore prima del trattamento.

L'esperimento è stato condotto aggiungendo a cellule Jurkat a semiconfluenza dosi scalari della molecola da saggiare; l'effetto proapoptotico è stato valutato a differenti tempi dall'inizio della coltura.

Il disegno sperimentale ha previsto l'aggiunta del composto solo all'inizio della coltura cellulare verificandone gli effetti ai tempi prestabiliti. I dati sulla mortalità cellulare sono stati ottenuti utilizzando esclusivamente tecniche di citofluorimetria a flusso con ioduro di propidio, tenendo conto che l'esecuzione di questi saggi risulta essere estremamente facilitata dal fatto che queste cellule vivono in sospensione.

La tabella 3 evidenzia come la sensibilità delle cellule Jurkat all'azione tumoricida del composto in oggetto sia estremamente più elevata rispetto alle cellule HepG2. Per tale motivo la verifica sulla mortalità cellulare è stata effettuata già dopo 2 ore dall'inizio del trattamento e quindi a 24, 48 e 72 ore.

La mortalità è stata calcolata in percentuale rispetto a 10.000 eventi standard acquisiti. In considerazione del fatto che i dati risultano essere estremamente sovrapponibili gli uni agli altri con una minima deviazione in tutte le letture effettuate per un singolo esperimento, vengono di seguito

riportate le medie di 5 letture citofluorimetriche senza deviazione standard.

Tabella 3

TRATTAMENTO	2 ore	24 ore	48 ore	72 ore
Controllo	3%	4%	5%	13%
ST1326 0,1 μ M	3%	4%	5%	13%
ST1326 0,25 μ M	3%	5%	8%	14%
ST1326 0,50 μ M	7%	15%	35%	56%
ST1326 1,0 μ M	6%	79%	83%	90%
ST1326 2,5 μ M	6%	91%	97%	99%
ST1326 5,0 μ M	8%	99%	99%	99%
ST1326 10 μ M	20%	99%	99%	99%

Inoltre, per escludere fenomeni di tossicità verso linfociti normali di sangue periferico (PBMC) da parte della molecola saggiata, sono stati eseguiti test di vitalità anche con cellule linfocitarie prelevate da soggetti sani e messe a contatto con il composto da analizzare.

I risultati ottenuti riportati in tabella 4 solo per il tempo a 72 ore, indicano che il composto saggiato non mostra tossicità nei confronti di PBMC alle dosi che si sono mostrate tumoricide nei confronti delle cellule Jurkat.

Tabella 4

TRATTAMENTO	72 ore
Controllo	9%
ST1326 1,0 μ M	9%
ST1326 5,0 μ M	10%
ST1326 10 μ M	10%
ST1326 20 μ M	12%

Esempio 3

Attività agonista del composto ST1326 a dosi subottimali sugli effetti antineoplastici della doxorubicina su cellule di epatocarcinoma umano (HepG2) *in vitro*.

La linea cellulare tumorale HepG2 è stata fornita da ATCC (American Type Cell Culture – Mannas, Virginia, numero HB-8065) e successivamente sviluppata nel nostro laboratorio. Le cellule sono state coltivate in terreno MEM integrato con FCS (siero fetale bovino) al 10%, Na-piruvato 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoacidi non essenziali 0,1 mM, e antibiotici (penicillina/streptomicina). Tale mezzo di coltura viene definito terreno completo. Tutti i terreni e i prodotti ancillari utilizzati per la coltura sono stati forniti da Hyclone-Celbio, Milano. Il disegno sperimentale prevedeva l'utilizzo del ST e di farmaci antineoplastici noti, quali la doxorubicina, verso cui le HepG2 presentano una notevole resistenza, per verificare l'azione agonista dei composti utilizzati. Per tale motivo la concentrazione di ST utilizzata è stata quella che da precedenti esperimenti risultava essere solo parzialmente in grado di indurre un effetto tumoricida (0,1 μ M; ~50% di mortalità cellulare) L'esperimento è stato eseguito utilizzando piastre da 96 pozzetti e aggiungendo a cellule HepG2 a semiconfluenza i seguenti composti:

doxorubicina alle dosi 0,25, 0,5, 5,0 μ g/mL;

ST alla dose 0,1 μ M in combinazione con doxorubicina alla dose 0,25 μ g/mL.

Dopo 24 ore di incubazione il terreno contenente la doxorubicina alle diverse concentrazioni e la combinazione dei due composti è stato rimosso e



le cellule sono state lavate con terreno completo. L'effetto antineoplastico è stato valutato dopo 3 giorni dall'inizio del trattamento con i composti in esame in confronto a cellule di controllo incubate con terreno completo per lo stesso periodo.

La tabella 5 evidenzia come la doxorubicina solo al dosaggio più elevato (5,0 µg/mL) è in grado di indurre una significativa mortalità cellulare. L'aggiunta di ST e di doxorubicina a concentrazioni pari a 0,1 µM e 0,25 µg/mL rispettivamente, ha permesso di dimostrare l'effetto tumoricida agonista della combinazione delle due molecole. La mortalità cellulare è stata calcolata in percentuale (media±deviazione standard) rispetto a 10.000 eventi acquisiti.

Tabella 5

TRATTAMENTO	3 giorni
Controllo	10,8±1
Doxorubicina 0,25 µg/mL	11,2±1,5
Doxorubicina 0,5 µg/mL	22,7±3,5
Doxorubicina 5,0 µg/mL	48,6±4,1
ST1326 0,1 µM + Doxorubicina 0,25 µg/mL	93,2±2,7

Esempio 4

Attività antineoplastica *in vivo* del composto ST1326 in ratti portatori di tumore di Yoshida

Ratti maschi Wistar (Morini s.r.l.), peso 190-200 g, sono stati stabulati alla temperatura di 22±2°C, con un ciclo di illuminazione di 12 ore di luce/12 ore di buio, con acqua e cibo (dieta standard) *ad libitum*. Un gruppo di ratti è

stato inoculato intraperitonealmente con 10×10^7 cellule AH-130 Yoshida ascites hepatoma (Llovera et al. Int. J. Cancer 61:138-41; 1995) gentilmente donate dal professor JM Argilés. Dopo 5-7 giorni dall'inoculo i ratti hanno sviluppato ascite evidenziabile già dall'esame macroscopico dell'addome. La paracentesi ha permesso di rilevare la presenza di circa 80-100 ml di fluido ascitico talvolta di aspetto emorragico contenente in media circa $15-20 \times 10^6/\text{mL}$ cellule tumorali.

Il protocollo sperimentale ha previsto che in settima giornata dall'induzione dell'ascite 15 animali (trattati) ricevessero 2 ml di una soluzione salina tamponata contenente ST (25 mg/kg i.p.), mentre altri 15 animali (controllo) ricevessero la sola soluzione tamponata. Lo stesso trattamento è stato quindi effettuato a giorni alterni per una settimana per un numero complessivo di trattamenti pari a 4 per animale. Il dosaggio è stato scelto sulla base di studi preliminari che hanno permesso di evidenziare il raggiungimento di una concentrazione plasmatica di ST pari a $6,1 \mu\text{M}$ dopo 5 ore dalla somministrazione intraperitoneale del prodotto. Gli animali sono stati successivamente mantenuti sotto osservazione per successive 3 settimane (follow-up) valutando il versamento ascitico, la presenza di eventuali masse neoplastiche sottocutanee nella sede dell'inoculo e la mortalità.

Per quanto riguarda la mortalità il dato più significativo è risultato essere la sopravvivenza degli animali trattati per tutte le 3 settimane di follow-up, mentre tutti i ratti di controllo sono deceduti tra la prima e la seconda settimana di follow-up.

L'analisi autoptica degli animali di controllo ha permesso di evidenziare la presenza di liquido ascitico contenente le cellule tumorali in

cavità addominale, un'iperplasia delle placche del Peyer intestinali, l'assenza di lesioni tumorali coinvolgenti gli organi addominali e infine lo sviluppo di una lesione tumorale a ridosso della fascia muscolare nella zona di inoculo delle cellule neoplastiche. I ratti trattati sono stati sacrificati alla fine della terza settimana di osservazione e l'esame autoptico non ha evidenziato alcuna alterazione nella cavità addominale né la presenza di cellule tumorali nel liquido ascitico e nell'area di inoculo.

Una sinopsi dei dati sperimentali è illustrata nelle tabelle 6 e 7.

Tabella 6

	Sopravvivenza a 1 settimana di follow-up	Sopravvivenza a 2 settimane di follow-up	Sopravvivenza a 3 settimane di follow-up
N° animali trattati con soluzione salina tamponata sopravvissuti	11	1	0
N° animali trattati con ST1326 sopravvissuti	15	15	15

Tabella 7

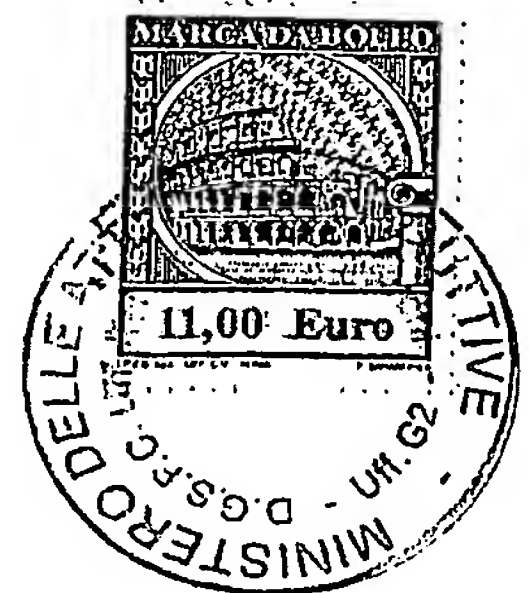
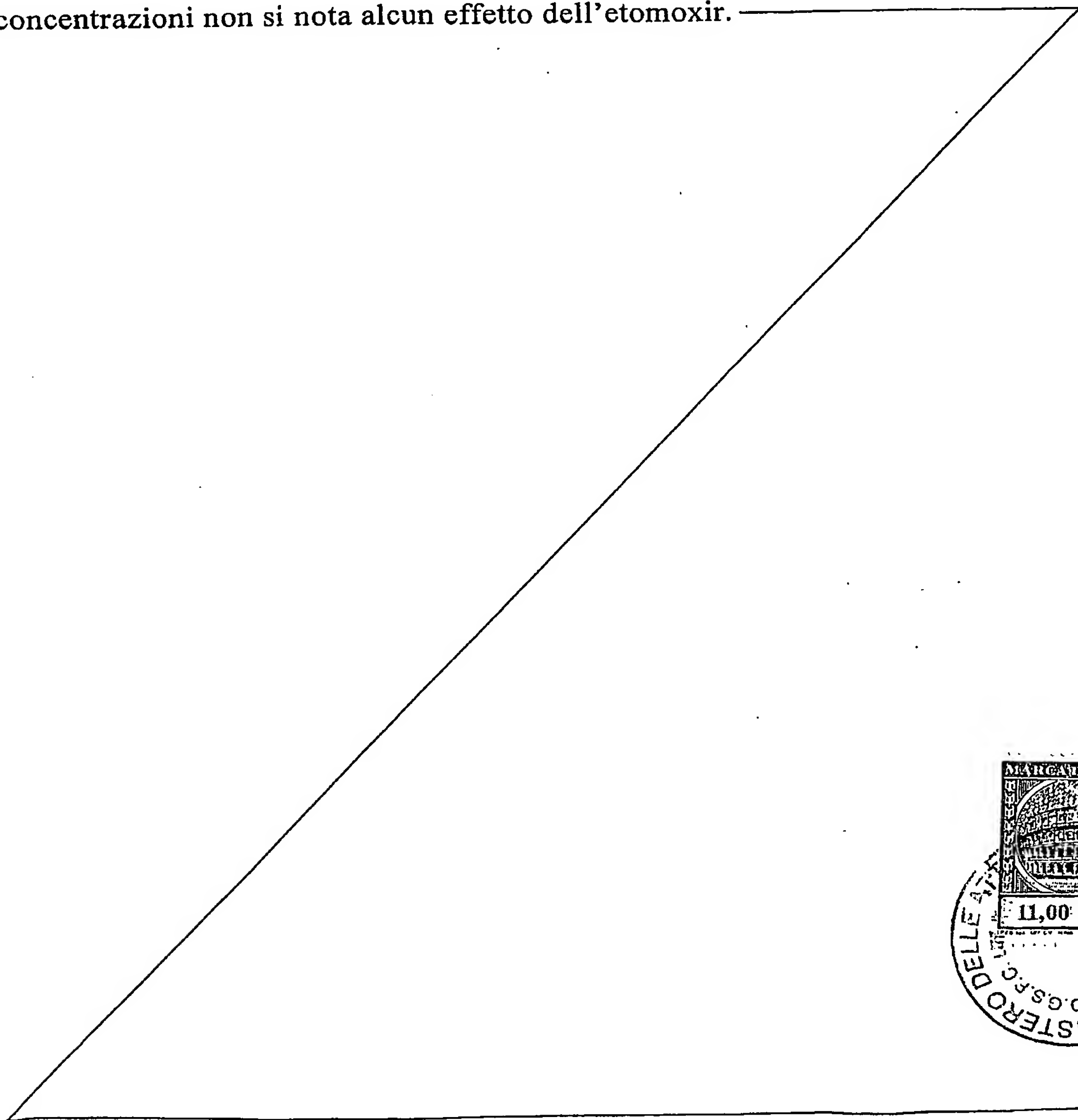
	Presenza di cellule tumorali in cavità addominale all'analisi autoptica	Presenza di massa tumorale nella zona di inoculo	Presenza di cachessia
N° animali trattati con soluzione salina tamponata	15	10	15
N° animali trattati con ST1326	0	0	1

Dati sperimentali ottenuti utilizzando altre vie di somministrazione (orale o i.v.) hanno dimostrato l'efficacia del trattamento anche se a dosaggi

differenti rispetto a quello i.p. (orale: 100 mg/kg; i.v.: 2 mg/kg).

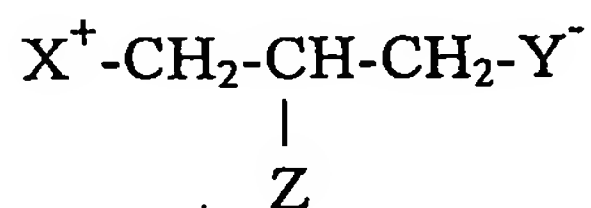
Breve descrizione della figura

I dati relativi alla vitalità cellulare sono espressi come percentuale rispetto al numero di cellule vitali delle colture di controllo considerato pari al 100%. (E= etomoxir; ST1326= composto saggiato). Come si nota dal grafico dimostrativo, già dopo 24 ore si rileva una significativa riduzione del numero di cellule in coltura a concentrazioni di ST al di sotto di 10 μ M. Alle stesse concentrazioni non si nota alcun effetto dell'etomoxir.



RIVENDICAZIONI

1. Uso di un composto di formula generale (I):



dove X^+ è scelto tra $N^+(R_1, R_2, R_3)$ e $P^+(R_1, R_2, R_3)$, in cui R_1, R_2, R_3 sono scelti tra H ed alchili uguali o diversi, lineari o ramificati, aventi da 1 a 9 atomi di carbonio,

$-CH=NH(NH_2), -NH_2, -OH$; oppure uno o più tra R_1, R_2 e R_3 formano con l'azoto un sistema eterociclico saturo o insaturo, monociclico o biciclico; con la condizione che almeno uno tra R_1, R_2, R_3 è diverso da H;

Z è scelto tra:

$-OR_4,$

$-OCOOR_4,$

$-OCONHR_4,$

$-OCSNHR_4,$

$-OCSOR_4,$

$-NHR_4,$

$-NHCOR_4,$

$-NHCSR_4,$

$-NHCOOR_4,$

$-NHCSOR_4,$

$-NHCONHR_4,$

$-NHCSNHR_4,$

$-NHSOR_4,$

$-NHSONHR_4,$

-NHSO₂R₄,

-NHSO₂NHR₄,

-SR₄,

dove R₄ è un alchile avente da 2 a 20 atomi di carbonio;

Y⁻ è scelto tra -COO-, -PO₃H-, -OPO₃H-, tetrazolato-5-il,

per la preparazione di un medicamento antitumorale.

2. Uso secondo la rivendicazione 1 di un composto di formula I, dove, indipendentemente uno dall'altro:

- X è scelto tra trimetilammonio, morfolinio, piridinio, pirrolidinio, chinolinio, chinuclidinio;
- R₄ è scelto tra eptile, ottile, nonile, decile, undecile, dodecile, tridecile, tetradecile, pentadecile, esadecile, eptadecile, octadecile, nonadecile, eicosile;
- Z è scelto tra i gruppi ureido (-NHCONHR₄) e carbammato (-OCONHR₄).

3. Uso secondo la rivendicazione 2 di un composto scelto dal gruppo comprendente:

- R,S-4-trimetilammonio-3-(nonilcarbammoil)-ammino-butirrato
- R,S-4-chinuclidinio-3-(tetradecilossicarbonil)-ossi-butirrato
- R,S-4-trimetilammonio-3-(nonilcarbammoil)-ossi-butirrato
- Acido R,S-4-trimetilammonio-3-(nonilossicarbonil)-ossi-butirrico cloruro
- R,S-4-trimetilfosfonio-3-(nonilcarbammoil)-ossi-butirrato
- R,S-4-trimetilammonio-3-(ottilossicarbonil)-ammino-butirrato
- R,S-4-trimetilammonio-3-(nonilossicarbonil)-ammino-butirrato
- R,S-4-trimetilammonio-3-ottilossi-butirrato

- R,S-4-trimetilammonio-3-tetradecilossi-butirrato
- R,S-1-guanidinio-2-tetradecilossi-3-(tetrazolato-5-il)-propano
- R,S-1-trimetilammonio-2-tetradecilossi-3-(tetrazolato-5-il)-propano
- R,S-3-chinuclidinio-2-(tetradecilossicarbonil)-ossi-1-propanfosfonato
monobasico
- R,S-3-trimetilammonio-2-(nonilamminocarbonil)-ossi-1-proanfosfonato
monobasico
- Acido R,S-3-piridinio-2-(nonilamminocarbonil)-ossi-1-propanfosfonico
cloruro
- R-4-trimetilammonio-3-(tetradecilcarbammoil)-ammino-butirrato
- R-4-trimetilammonio-3-(undecilcarbammoil)-ammino-butirrato
- R-4-trimetilammonio-3-(eptilcarbammoil)-ammino-butirrato
- R,S-4-trimetilammonio-3-(noniltiocarbammoil)-ammino-butirrato
- R-4-trimetilammonio-3-(nonilcarbammoil)-ammino-butirrato
- S-4-trimetilammonio-3-(nonilcarbammoil)-ammino-butirrato
- S-4-trimetilammonio-3-(tetradecilcarbammoil)-ammino-butirrato
- R,S-4-trimetilammonio-3-tetradecilammino-butirrato
- R,S-4-trimetilammonio-3-ottilammino-butirrato
- R,S-4-trimetilammonio-3-(decansolfonil)-ammino-butirrato
- R,S-4-trimetilammonio-3-(nonilsulfamoil)-ammino-butirrato
- S-4-trimetilammonio-3-(dodecansolfonil)-ammino-butirrato
- R-4-trimetilammonio-3-(dodecansolfonil)-ammino-butirrato
- S-4-trimetilammonio-3-(undecilsulfamoil)-ammino-butirrato
- R-4-trimetilammonio-3-(undecilsulfamoil)-ammino-butirrato
- R-4-trimetilammonio-3-(dodecilcarbamoil)-ammino-butirrato

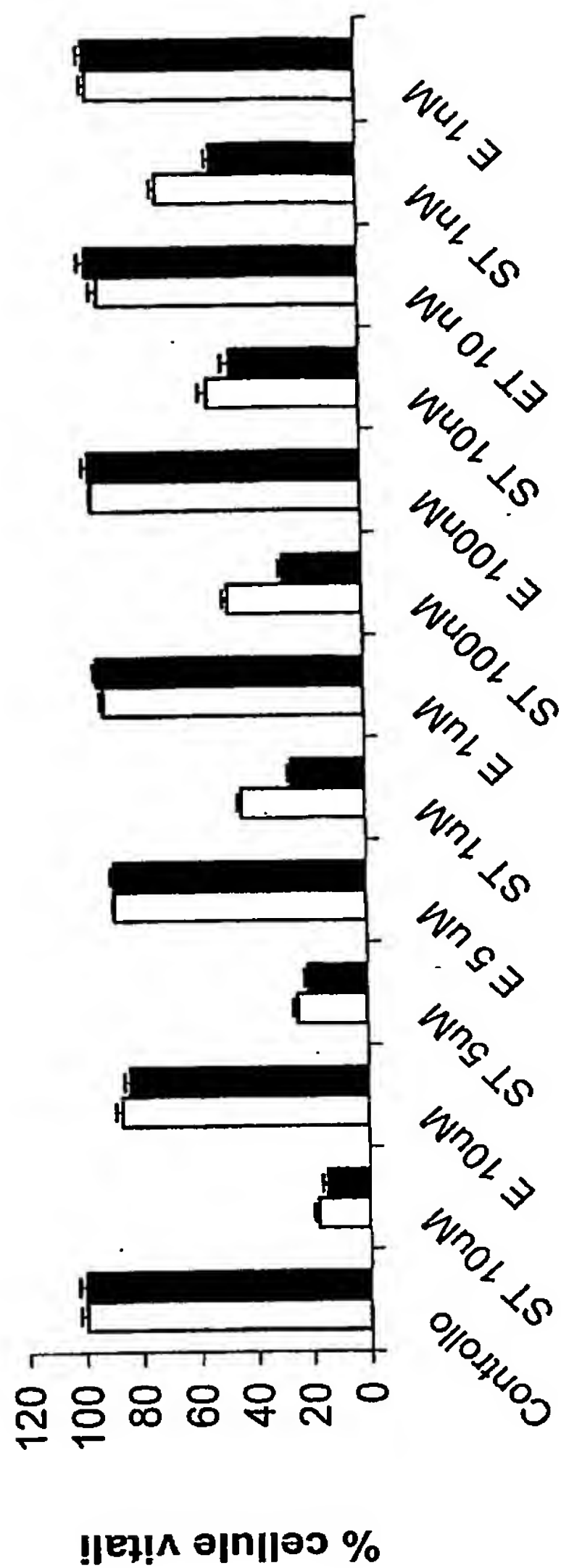
- R-4-trimetilammonio-3-(10-fenossidecylcarbamoil)-ammino-butirrato
- R-4-trimetilammonio-3-(trans-b-stirenesolfonil)-ammino-butirrato
- 4. Uso secondo la rivendicazione 3 del composto R-4-trimetilammonio-3-(tetradecylcarbamoil)-ammino-butirrato.
- 5. Uso di un composto (I) secondo le rivendicazioni 1-4 per la preparazione di un medicamento antitumorale da utilizzare nel trattamento delle leucemie o degli epatocarcinomi.
- 6. Preparazione terapeutica contenente un composto secondo le rivendicazioni 1-4 in combinazione con un agente antitumorale scelto tra composti citotossici o citostatici, antimetaboliti, alcaloidi, antibiotici, agenti alchilanti, peptidi, modificatori della risposta biologica, citochine, per uso simultaneo, separato o sequenziale nel trattamento del tumore.
- 7. Preparazione secondo la rivendicazione 6, contenente antibiotici antraciclinici.
- 8. Preparazione secondo la rivendicazione 7, dove detto antibiotico è doxorubicina.

Milano, 12 febbraio 2004

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.



□ 24 h
■ 48 h



Figura

MI 2004 A 0 0 0 2 3 0

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

[Signature]

